

⑨ 日本国 許庁(JP) ⑩ 特許出願公開  
 ⑪ 公開特許公報(A) 昭60-120817

⑫ Int. Cl.<sup>4</sup> 識別記号 庁内整理番号 ⑬ 公開 昭和60年(1985)6月28日  
 A 61 K 35/74 7138-4C  
 9/08 8742-4C  
 9/10 6742-4C 審査請求 有 発明の数 2 (全9頁)

⑭ 発明の名称 医療用組成物

⑮ 特 願 昭59-198764

⑯ 出 願 昭59(1984)9月25日

優先権主張 ⑰ 1983年9月23日 ⑱ 米国(US) ⑲ 535037

⑳ 発 明 者 ジョン レオナード アメリカ合衆国、モンタナ 59828、コーバリス、ノース  
 カントレル イースト ホーカーレーン 615  
 ㉑ 出 願 人 リビ イミューノケム アメリカ合衆国、モンタナ 59840、ビー。オー。ボックス  
 リサーチ、インコーポ ス 1409 ハミルトン、ノース イースト オールド コ  
 レイテイド ーバリス ロード 581  
 ㉒ 代 理 人 弁理士 青 木 朗 外4名

明細書の抄出(内容に変更なし)

明 細 書

1. 発明の名称

医療用組成物

2. 特許請求の範囲

1. 医療用組成物であって、医療的に有効量の、

(a) 約7~20重量%の蛋白質、約10~16重量%の糖、及び約35~55重量%の脂肪酸を含んで成る、微生物から得られた精製されたビリジン可溶性抽出物；

(b) 375~475 mg/mlの濃及び約1700~2000 mg/mlの脂肪酸を有し、そして検出し得る2-クト-3-アオキシオクタノエ-ートを有しない精製無毒化エンドトキシン；及び

(c) 医薬として許容される担体；  
 を含んで成る組成物。

2. 微生物が、*M. bovis* (*M. bovis*) BCG、*M. phlei* (*M. phlei*)、*M. smegmatis* (*M. smegmatis*)、*M. kanasii* (*M. kanasii*)、*Nocardia rubra* (*Nocardia rubra*)、*Nocardia asteroides* (*Nocardia asteroides*)、*Propionibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*) タイプⅡ、及び*Corynebacterium parvum* (*Corynebacterium parvum*) から成る群から選ばれた特許請求の範囲第1項記載の組成物。

*asteroides*)、*Propionibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*) タイプⅡ、及び*Corynebacterium parvum* (*Corynebacterium parvum*) から成る群から選ばれた特許請求の範囲第1項記載の組成物。

3. 前記微生物が*Corynebacterium parvum* (*Corynebacterium parvum*) から成る群から選ばれた特許請求の範囲第1項記載の組成物。

4. 前記微生物が*Propionibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*) タイプⅡである特許請求の範囲第2項記載の組成物。

5. 前記抽出物が約12重量%の蛋白質、及び約45重量%の脂肪酸を含有する特許請求の範囲第1項記載の組成物。

6. 前記抽出物と前記精製無毒化エンドトキシンとの比率が1:1~100:1である特許請求の範囲第1項記載の組成物。

7. 前記抽出物の量が約50~5000 µgであり、そして前記精製無毒化エンドトキシンの量が約5~1000 µgである特許請求の範囲第6項記載の方法。

8. 前記抽出物の量が約500  $\mu$ gであり、そして前記精製無毒化エンドトキシン(PB)の量が約100  $\mu$ gである特許請求の範囲第7項記載の方法。

9. 前記組成物が凍結乾燥形である特許請求の範囲第1項記載の方法。

10. 前記担体が生理的塩溶液である特許請求の範囲第1項記載の組成物。

11. 前記組成物が油滴乳剤形である特許請求の範囲第1項記載の組成物。

12. 前記油が軟質油、スクワレン、スクワラン、及び7- $\alpha$ -ヘキシルオクタデカンから成る群から選択される特許請求の範囲第11項記載の組成物。

13. 前記油が、組成物の全体積を基礎として約0.5～3.0容量%の量で存在する特許請求の範囲第11項記載の組成物。

14. 組成物の全体積を基礎として約0.02～0.25容量%の量の洗剤をさらに含んで成る特許請求の範囲第1項記載の組成物。

15. 特許請求範囲第1項に記載の組成物を温血

20. 1週間の間隔で注射することから成るヒトにおける免疫応答を発生せしめるための方法において使用するための特許請求の範囲第1項記載の組成物。

21. 特許請求の範囲第1項記載の組成物を温血動物に投与することから成る温血動物における腫瘍の治療方法において使用するための特許請求の範囲第1項記載の組成物。

22. 明細書に後記する医薬用組成物。

23. 温血動物、特にヒトにおいて免疫応答を発生せしめるための方法において使用するための特許請求の範囲第1項記載の組成物。

### 3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

この発明は、精製無毒化エンドトキシン(RDE)を微生物のポリジン可溶性抽出物(PB)と共に含む医薬用組成物に向けられる。この組成物において使用されるRDEは、約350～475  $\mu$ mol/gの糖及び約1700～2000  $\mu$ mol/gの脂肪酸を有し、検出し得る2-クト-3-デオキシオクタ

動物に投与することから成る温血動物に免疫応答を発生せしめる方法において使用するための特許請求の範囲第1項記載の組成物。

16. 前記組成物を15回まで非経腸的又は直接的に腫瘍細胞に注射することから成る温血動物において免疫応答を発生せしめるための方法において使用するための特許請求の範囲第1項記載の組成物。

17. 少なくとも1週間の間隔で注射することから成る温血動物において免疫応答を発生せしめるための方法において使用するための特許請求の範囲第1項記載の組成物。

18. 特許請求の範囲第1項記載の組成物をヒトに投与することから成るヒトにおいて免疫応答を発生せしめる方法において使用するための特許請求の範囲第1項記載の組成物。

19. 前記組成物を15回まで非経腸的又は直接的に腫瘍細胞に注射することから成るヒトにおいて免疫応答を発生せしめるための方法において使用するための特許請求の範囲第1項記載の組成物。

ノエートを有しないものとして特徴付けられる。PEは、約3～20重量%の蛋白質、約10～40重量%の糖、及び約35～60重量%の脂肪酸を含有する。この組成物は、温血動物における癌性腫瘍の侵蝕及び/又は退化を得るために効果的である。

(従来の技術)

コリネバクテリウム・パルブム (*Corynebacterium parvum*) のとき細菌が、腫瘍増殖の阻害を誘導する成分を単離し、そして特徴付けるための実験に使用された[例えば、Anti Tumor Activity and Lymphoreticular Stimulation Properties of Fractions Isolated from *C. parvum*; Cantrell 等, Cancer Research 39, 3554-3563頁(1979年9月)を参照のこと]。抗腫瘍活性とは別に、C. パルブムはリンパ網状系の有効な刺激物質であって脾臓及び肝臓の重量及び胚子発生の不所望の増加をもたらす。C. パルブムのとき微生物のポリジン可溶性抽出物が、従来技術の生成物に随伴する不所望

の毒性効果を伴わないで強力な抗腫瘍性を有することが発見された。

微生物及び変異株を包含するエンテロバクテリアセー(Enterobacteriaceae)から得られるエンドトキシン抽出物が知られている。これらの抽出物は、種々の免疫性腫瘍の免疫療法のために使用されてきた[Peptides as Requirement for Immunotherapy of the Guinea-Pig Line-10 Tumor with Endotoxins; Ribi 等, Cancer Immunol. Immunother. Vol 7, 43-58頁(1979)を参照のこと]。しかしながら、エンドトキシン抽出物は毒性が強く、そしてそれ故に癌性腫瘍の治療における使用が限定されることが知られている。腫瘍退化能を維持しながらエンドトキシンを無毒化する努力が行われてきた。Ribi 等に表示されているように、アジュバント性を維持しながらエンドトキシンを無毒化するために知られている化学的方法、例えばサクニル化及びブチリル化は、エンドトキシン活性及び腫瘍退化能の両者を喪失せしめる。従って、高

い癌退化能を有しそして毒性を全く又はほとんど有しないエンドトキシン生成物を得るための従来技術の試みは、全く成功していない。

(発明が解決しようとする問題点)

従って、この発明は、微生物のポリリン可溶性抽出物を精製無毒性エンドトキシンと共に含有する医薬組成物を提供することを目的とする。

この発明の他の目的は、微生物のポリリン可溶性抽出物及び精製無毒性エンドトキシンを含有する組成物を使用する腫瘍動物及びヒトにおける腫瘍の治療方法を提供することである。

(問題点を解決するための手段)

微生物のポリリン可溶性抽出物(P.E.)

P.E.は、約3~20重量%の蛋白質、約10~40重量%の糖、及び約35~60重量%の脂肪酸をC. パルプム(C. parvum)の全細胞と共に含有し、そして好ましくは約5重量%の蛋白質、約35重量%の糖、及び約55重量%の脂肪酸を含有する。

ここで、糖の使用に関して限定は存在せず、すべての糖を使用することができる。このことは脂

肪酸についても真実であり、使用し得る脂肪酸についての限定は存在しない。

蛋白質はアミノ酸及びアンモニアを含んで成り、そしてこのアミノ酸には例えば次のものが含まれる(この測定のためにベックマンアミノ酸分析器を使用した)。

アスパラギン	0.273
スルオニン	0.108
セリン	0.585
ムラミン酸	0.219
グルタミン酸	0.267
グリシン	0.39
アラニン	0.173
ジアミノピメリン酸	0.444
イソロイシン	0.121
ロイシン	0.167
フェニルアラニン	0.034
ヒスチジン	0.088
リジン	0.544
アンモニア	0.524

上記の量は重量%であり、そして全蛋白質は6.34重量%である。

ポリリン可溶性抽出物を得るために任意の微生物を使用することができ、これには例えばM. ボビス(M. bovis) BCG、M. フレイ(M. phlei)、M. スメグマテス(M. smegmatis)、M. カンザシー(M. kansasii)、ノカルディア・ルブラ(Nocardia rubra)、ノカルディア・アステロイデス(Nocardia asteroides)、プロピオニバクテリウム・アクネス(Propionibacterium acnes)タイプII、及びコリネバクテリウム・パルプム(Corynebacterium parvum)が含まれる。コリネバクテリウム・パルプム、及びプロピオニバクテリウム・アクネスタイプIIが特に好ましい。

微生物の全細胞、好ましくはペースト状のものをポリリンと混合する。得られた混合物を分離して、ポリリン可溶性抽出物を含有する面分とポリリン残渣とを得る。場合によっては、ポリリンを用いて上記のようにしてポリリン残渣を再分離機

作にかけて、追加量の目的抽出物を取り出す。

次に、抽出物からビリジンを除却し、そして乾燥した抽出物を、蒸留水のごとき適当な液に対して透析する。全細胞及び細胞断片汚染物が存在しないことを電子顕微鏡により確認する。次に、得られた精製抽出物を公知の方法に従って凍結乾燥することによって安定な生成物を得る。

この発明に従って製造したビリジン可溶性抽出物をRDEと混合して、脾臓及び肝臓の拡大を刺激することなく高い抗腫瘍活性を有する組成物を製造する。ビリジン可溶性抽出物を水に懸濁すれば、この懸濁液を水可溶性成分と水不溶性成分に分離することができる。水可溶性抽出物は、非経腸的に容易に注射することができ、同時にビリジン抽出物の抗腫瘍活性を保持しているから、水可溶性抽出物が最も好ましい。この組成物によって治療することができる腫瘍には、動物腫瘍、例えばウシ扁平細胞癌、ウシ線維肉腫、ウマ肉腫、ウマ黒色腫、ウマ扁平細胞癌、イヌ乳癌、イヌ腺癌、及びイヌ黒色腫、並びにヒト腫瘍、例えば乳房腫瘍、肺癌

癌、結腸癌、悪性黒色腫、扁平細胞癌、卵巣腫瘍、子宮腫瘍、膀胱腫瘍、頭部腫瘍及び頸部腫瘍が含まれる。

#### 精製無毒化エンドトキシン(RDE)

RDEを製造するための出発材料として使用されるタイプのエンドトキシン抽出物は、細菌及び変異株を包含する任意のエンテロバクテリアから得ることができる。例えば使用し得るタイプの微生物の代表的な属として、サルモネラ (*Salmonella*)、シゲラ (*Shigella*)、エセリヒア (*Escherichia*)、ブルセラ (*Brucella*)、ボルデテラ (*Bordetella*)、シトロバクター (*Citrobacter*)、シュードモナス (*Pseudomonas*)、パステレラ (*Pasteurella*)、ナイゼリア (*Neisseria*)、プロテウス (*Proteus*)、クレブシエラ (*Klebsiella*)、及びセラチア (*Serratia*)を挙げるができる。

次の種、すなわちB. ミネソタ (*S. minnesota*)、B. ティフィムリウム (*S. typhimurium*)、B. ペルツシス (*B. pertussis*)、B. アボルトス

(*B. abortus*)、S. エンテリチディス (*S. enteritidis*)、E. コリ (*E. coli*)、B. ティフィ (*S. typhi*)、S. マルセッセンス (*S. marcescens*)、S. ティボサ (*S. typhosa*)、シゲラ・フレクスニ (*Shigella flexni*)、及びB. アボルトス・エクイ (*S. abortus equi*)が典型的に使用される。

出発材料として使用されるエンドトキシン抽出物は、幾つかの公知の方法の1つにより調製することができる。公知の方法は、例えば次の文献に記載されている。

1) Webster, M.E., Sagin, J.F., Landy, M., 及び Johnson, A.G., *J. Immunol.* 1955, 744, 55.

2) Westphal, O., Luderitz, O., 及び Bister, F., *Z. Naturforsch.* 76 148 (1952).

3) Westphal, O., *Pyrogens, Polysaccharides in Biology, Tr. Second Macy Conference* (George F. Springer,

ed.), Madison, N.J. Madison Printing Co., 1957, 115.

4) Galanos, C., Luderitz, O., Westphal, O., *Eur. J. Biochem.* 9 245 (1969).

5) Chen, C.H., Johnson, A.G., Kusal, N., Key, B.A., Levin, J., Nowotny, A., *J. Infect. Dis.* 128 543 (1973).

6) Ribl, E., Haskins, W.T., Landy, M., Milner, K.C., *The Journal of Experimental Medicine* 114 647 (1961).

7) Lelve, L., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 21 290 (1965).

8) Ribl, E., Milner, K.C., 及び Perrine, T., *J. Immunol.* 82 75 (1959).

エンドトキシン抽出物を得るための好ましい方法は、Chem 等により開示された方法、すなわちメタノール/クロロホルム沈殿法である。

次にメタノール/クロロホルム沈殿物(MCP)を、有機酸又は無機酸と反応せしめ、そして次に

凍結乾燥して、出発エンドトキシン材料より低い毒性及び発熱性を有する加水分解された粗脂質Aを製造する。次に、この材料を、粗脂質Aを溶解することなく脂肪酸及び他の不純物を特異的に溶解することができる溶剤で処理する。無毒化され精製された脂質Aの脂肪酸含量は毒性エンドトキシンについて観察された量の約半分であり、脂肪酸含量がエンドトキシンの毒性効果と関連することが示唆される。

MCPとの反応に使用する好ましい無機酸は塩酸、硫酸、又は硝酸であり、そして好ましい有機酸はトルエンスルホン酸又はトリクロロ酢酸である。反応は、約90℃～130℃の温度において、完全な加水分解のために十分な時間、通常は約15～60分間にわたって適切に行うことができる。

粗無毒化エンドトキシンの調製は、有機溶剤、例えばクロロホルム、メタノール、及びエタノール、又はこれらの混合物の存在下で、出発材料と酸とを反応せしめることにより構成することができる。

セファックスカラムについて使用するのと同じであるが、すべての混合物に水及び/又はジエチルアミンを約1モまでの濃度で加えることができる。

粗無毒化エンドトキシンからRDEを製造するための他の方法には、約20～63ミクロンの粒子サイズを有する低圧シリカゲル60カラムに溶液を通し、そしてクロロホルム、メタノール、水及び水酸化アンモニウムから成る溶剤を用いる方法が含まれる。溶剤成分の好ましい体積比は50:25:4:2である。

精製無毒化エンドトキシン(RDE)は、検出し得る2-ケト-3-デオキシオクタノエートを有さず、約350～475nmol/mgの糖及び約1700～2000nmol/mgの脂肪酸を有する。

組成物は、医薬として許容される媒体、例えば油滴乳剤又は生理的塩溶液中で注射により投与され、そして好ましくは、さらに具体的に下配する条件下で腫瘍に直接投与される。投与はN注射又はN注入により行うことができる。

組成物は、例えば凍結乾燥法により安定化し、

得られた粗脂質Aを、脂肪酸及び他の不純物を溶解するために好ましい溶剤であるアセトン中に懸濁する。次に溶剤を除去して粗無毒化エンドトキシンを得る。

粗無毒化エンドトキシンを次に溶剤に溶解し、そしてこの溶液を適当なクロマトグラフカラム、例えば分子排除(exclusion)クロマトグラフカラムに通してRDE面分を分離し、次にこの面分を、溶剤を除去した後一緒にする。この粗無毒化エンドトキシン溶液を、溶剤、例えばクロロホルム、メタノール、アセトン、ピリジン、エーテルもしくは酢酸、又はこれらの混合物の存在下でセファックスカラムに通す。カラムの圧力は変えることができるが、典型的にはおよそ大気圧～100lb<sub>s</sub>/in<sup>2</sup>の範囲であり、そして流速は約0.1～1.0ml/分である。

粗無毒化エンドトキシン溶液は、セファックスカラムについて上記したのと同じ圧力条件下でDEAE-セルロースカラムに通す。流速は約2～15ml/分に保持する。使用する溶剤もまたセフ

そして力価を喪失することなく再構成することができる。

動物を治療するための1回の注射におけるRDEの量は約25～500μg/ml、適切には50～100μg/mlであり、そしてPEの量は約25～500μg/ml、適切には約100～250μg/mlである。

腫瘍に注射する生物学的製剤のml数は次の表に従って腫瘍の大きさにより決定する。

腫瘍の大きさによる動物への投与量

腫瘍の直径 (cm)	注射する生物学的製剤の量 (ml)
0～1	0.5以下
1～2	0.5～2.5
2～3	2.5～5
3～5	5～10
5～8	10～15
8より大	15～20

注射当りの最大投与量はRDEが約10mg、そしてPEが約25mgである。治療過程は約2週間の

間隔で投与される4~10回までの注射から成る。

適当な注射媒体、例えば生理的塩溶液中のこの発明の組成物は、ヒト腫瘍に直接投与される。1回の注射中のRDEの量は約5~1000μg、適切には約25~500μgである。PEの量は約50~5000μg、適切には約200~3000μgである。RDEの好ましい投与量レベルは約100μgであり、そしてPEについては約1000μgである。上記の投与量レベルはすべて典型的な70kgの成人患者を基礎にしたものである。注射はおよそ1週間に1回行い、合計注射回数が約15回までとする。

上記のように、温血動物又はヒトの治療のための組成物は、塩溶液又は油剤の形で使用することができる。使用する油の量は、組成物の全容量を基礎にして約0.5~3.0容量分の範囲である。約0.75~1.5容量分の油を使用するのが好ましい。このような油の例には、鯊魚油、スクワラン、7- $\alpha$ -ヘキサシロキタデカン、コノコスーパーオイル (Conoco superoil)、及びド레이크ール (Drakeol) 6VR鯊魚油 [ペンレコ社 (Pennreco

Company)、パトラー、ペンシルバニア]が含まれる。

次に、ホモジナイズされた油混合物を洗剤と混合する。場合によってはこの洗剤は混合前に塩溶液に溶解する。洗剤の量は典型的には組成物の全容量を基礎にして約0.02~0.20容量分、そして好ましくは約0.10~0.20容量分である。トウイーン80、アルラセル (Arlacel) (アトラスケミカル社製) のごとき任意の一般的な洗剤を使用することができる。

次に、洗剤の添加によって得られる混合物をホモジナイズして、顕微鏡観察により測定した場合に高パーセンテージの油滴が活性成分によって被覆されている懸濁液を形成せしめる。

次に例によりこの発明をさらに具体的に説明する。但し、これによってこの発明の範囲を限定するものではない。

#### 例1. プロピオニバクテリウム・アクネスタイプⅡ (VPI 0204株) からのビリジン可溶性抽出物の調製

プロピオニバクテリウム・アクネスタイプⅡ (VPI 0204株) を、37℃にてNIHテオグリコレートブロス中で48~72時間培養し、そして集菌して全細胞ペーストを得た。次に、このペーストを500mlの蒸留水により洗浄した。9.0g (湿重量) の洗浄ペーストを200mlの純ビリジンと混合し、そして4℃にて1700rpmにて1時間遠心分離した。ビリジン可溶性抽出物を上清液として取り出した。残った残渣を、上記と同じ条件下で追加のビリジンを用いて抽出した。ワットマンNo.1濾紙を用いて濾過した後、ビリジン抽出物をブールし、そしてブローターペーパー (Buchi Rotavapor) [ブリクマンインストルメンツ (Brinkmann Instruments)、ウエストバレー、ニューヨーク] 中で50℃にて蒸発せしめることにより溶剤を除去した。乾燥したビリジン抽出物を、蒸留水に対して十分に透析し、そして次に凍結乾燥した。得られた精製ビリジン抽出物は約5重量%の蛋白質、約3.5重量%の糖、及び約5.5重量%の脂肪酸を含有していた。抽出

物を、電子顕微鏡のもとで試験し、そして汚染全細胞及び細胞壁断片を含有しないことを見出した。ビリジン可溶性抽出物の収率は9% (8.1g) であった。

#### 例2. M. ゴビス BCG 株からのビリジン可溶性抽出物の調製

M. ゴビス BCG 株 をサートン (Sautons) 培地中で37℃にて3~4週間増殖せしめ、そして収穫することにより洗浄全細胞ペーストを得た。次に、50g (湿重量) の洗浄ペーストを例1と同様にして処理し、7% (3.5g) のビリジン可溶性抽出物を得た。抽出物は、1.5重量%の蛋白質、1.0重量%の糖、及び5.2重量%の脂肪酸を含有していた。

#### 例3. 水抽出物の調製

500mlのビリジン抽出物を100mlの蒸留水中で15~30分間超音波処理した。得られた懸濁液を、RC2B 遠心分離機中、4℃、12000rpmにて40分間遠心分離した。上清液をアkantし、そして貯蔵した。残渣を上記のようにして

さらに2回抽出した。上清液を凍結乾燥ビン中で一括にし、凍結し、そして凍結乾燥した。収量230mg(46%)。

#### 例4. 粗無毒化エンドトキシンの調製

Chem等, J. Infect. Dis. 128 543

(1973)の方法に従って調製されたメタノール/クロロホルム沈殿物のサンプル650mgを、振盪器を装着しそして超音波処理器に浸漬された3つ口丸底フラスコ中で、150mlの0.1N HCl中に懸濁した。超音波処理の後、ガラス熱電を、120℃に保持された油浴に浸けた。この温度は、フラスコの内部温度を溶液の沸点に到達させ又はそれより高くすることができる。フラスコに、その1つの口を通して密着ガス管に連結された毛細管を設けることにより、溶液の過加熱を最小にした。

加水分解を30分間継続し、そして溶液を氷浴中で冷却し、超音波処理することによって固形物を分散せしめ、そしてコレックスチューブに分配した。フラスコを蒸留水で洗浄してフラスコの側部に付着しているすべての物質を取り出し、そし

2500rpmにて約10分間遠心分離した。上清液をデカントし、そして5mlのクロロホルム/メタノール(2:1)混合物を残渣に加えて溶解せしめた。チューブ当り2mlの水を加え、そして溶液を混合した。2相溶液を2500rpmにて10分間再遠心分離した。上部水相を廃棄し、そして1mlのクロロホルム/メタノール(4:1)混合物を各チューブに加えて透明な溶液を得た。溶液を一括にし、そして溶剤をロータリーエバポレーター上で蒸発せしめた。残渣を高真空下で乾燥し、そして45mgの粗脂質Aを得た。20mgのこの物質を冷(0℃)アセトンで処理し、超音波処理し、そしてワットマンNo1重力伊過装置を通して5℃にて伊過した。乾燥した後、13mgの粗無毒化エンドトキシンが残留した。

#### 例6. 精製無毒化エンドトキシンの調製

110gのLH-20-100(25-100ミクロンの粒子サイズ; フェルマシア)を600mlのクロロホルム/メタノール(2:1)混合物と混合し、30分間放置した。得られたスラリーを、

て洗液をコレックスチューブ中の懸濁液に加えた。12000rpmにて80分間遠心分離を行った。上清液をデカントし、そして廃棄した。固体残渣を蒸留水に再懸濁し、懸濁液が十分に分散するまで超音波処理し、そして再度遠心分離した。次に、遠心分離を反復した。残渣を蒸留水に入れ、凍結し、そして凍結乾燥して382mgの粗脂質Aを得た。150mgのこの物質を冷(0℃)アセトンで処理して脂肪酸を除去し、超音波処理し、そしてワットマンNo1重力伊過装置を通して5℃にて伊過した。乾燥後、100mgの粗無毒化エンドトキシンが残留した。

#### 例5. 粗無毒化エンドトキシンの調製

MCP(メタノール/クロロホルム沈殿物)のサンプル120mgを12mlの純メタノールに懸濁し、超音波処理して固形物を分散せしめ、そして6本のネジ蓋バイアルに分配した。各チューブに2mlの0.2N HClを加え、そして得られた懸濁液を沸騰水浴中で45分間インキュベートした。加水分解後、チューブを氷水浴中で冷却し、そして

圧力設定器を有する20×1000mmガラス製クロマトグラフィーカラム(BBLラボラトリーズ)に加えた。充填が完了した後、カラムを、テフロン製圧力チューブによりISCOモデル132ポンプに連結した。400mlのクロロホルム/メタノール(4:1)混合物をポンプにより3ml/分の流速でカラムに通した。例4に従って調製した100mgの粗無毒化エンドトキシンを、2.5mlのクロロホルム/メタノール(4:1)混合物と共に、サンプルループを介してカラムに適用した。流速を1ml/分に下げ、150mlの溶出液を集めた後、溶出液をフラクションコレクターに連結した。4mlずつの画分を集め、そしてこの画分を薄層クロマトグラフィー(E.メルク、厚さ0.25mm、溶融剤としてクロロホルム/メタノール/H<sub>2</sub>O/NH<sub>4</sub>OH(50:25:4:2)を使用)により分析することによって、精製無毒化エンドトキシン画分を決定した。

精製無毒化エンドトキシン画分を一括にし、そして溶剤を蒸発せしめて、30mgの精製無毒化エ

ンドトキシンを白色粉末として得た。

#### 例7. 精製無毒化エンドトキシンの調製

3.3gのDEAE-セルロース(ワットマンDE-32)を150mlの水酢酸に懸濁し、そして10分間ゆっくり攪拌してスラリー粉末を得た。混合物を一夜放置した。

スラリーを25×400mmのカラムに注入し、かるくたたいて沈降せしめ、この後過剰の酸を除去せしめた。カラムを2000mlのメタノールで洗浄し、次に200mlのクロロホルム/メタノール(4:1)混合物で洗浄した。例4に従って調製された粗無毒化エンドトキシンのサンプル100mgを、3mlのクロロホルム/メタノール(4:1)混合物、又はクロロホルム/メタノール/水(80:20:1)混合物と共にカラムに加えた。カラムを、350mlのクロロホルム/メタノール(4:1)混合物により溶出し、次に300mlのメタノール/水(99:1)混合物により溶出した。直線グラジエント装置を用いて、100mlメタノールから出発しそしてメタノール中0.2M酢

酸で終る2000mlの直線グラジエントによりカラムを溶出した。カラムの溶出は6ml/分の流速で行い、そして15mlの画分を集めた。各画分を、Bartlett G.R., J. Biol. Chem. 234, 466-471 (1959)の方法に従って全燐含量について分析した。画分をプールし、そしてロータリーエバポレーター上でほとんど乾燥するまで蒸発せしめ、そして分液漏斗中の10mlのクロロホルム/メタノール(2:1)混合物及び40mlの0.001M酢酸中に入れた。下相を分離し、ワットマンNo2伊紙を通して伊過し、そして蒸発乾燥して、19.2mgの精製無毒化エンドトキシンを得た。

#### 例8.

生後8~10週間の老雌性C3H<sub>2</sub>BF<sub>2</sub>Jマウス23匹に、10<sup>5</sup>個の卵巣奇形癌細胞を腹腔内注射した。24時間後、5匹のマウスに、50μgのRDEを含有する等張塩溶液0.2~0.5mlを1回注射し、そして6匹のマウスに、300μgのPE及び50μgのRDEを含有する塩溶液0.2~0.5mlを

1回注射した。最後に、12匹のマウスに对照として0.2~0.5mlの塩溶液を1回注射した。21日後、RDEを注射された5匹のマウスの内4匹が腫瘍の完全な退化を示し、そしてRDE及びPEを注射された6匹のマウス中6匹が同様の結果を示した。他方、対照群の12匹のマウス中10匹が21日目までに死に、そして残り2匹は、癌細胞の証拠を示した。

#### 例9.

生後8~10週間の老雌性C3H<sub>2</sub>BF<sub>2</sub>Jマウス45匹に、10<sup>5</sup>個の卵巣奇形癌細胞を注射した。24時間後、15匹のマウスに、1400μgのPEを含有する等張塩溶液0.2~0.5mlを1回注射し、そして15匹のマウスに、300μgのPE及び50μgのRDEを含有する塩溶液0.2~0.5mlを1回注射した。最後に、15匹のマウスに、对照として0.2~0.5mlの塩溶液を注射した。30日後、PEを注射された15匹のマウス中5匹はなお生存しており、そしてRDE及びPEを注射された15匹のマウス中8匹が腫瘍の退化を示し、そし

てなお生存した。他方、対照群の15匹のマウス中14匹が死に、残り1匹のマウスは腫瘍の退化を示した。

#### 特許出願人

リビ イミムケム リサーチ,  
インコーポレイティド

#### 特許出願代理人

弁理士	青	木	朋
弁理士	西	館	和 之
弁理士	福	本	頼
弁理士	山	口	昭 之
弁理士	西	山	雅 也



特開昭60-120817(9)

手続補正 (方式)

昭和59年12月18日

特許庁長官 志賀 学 殿

1. 事件の表示

昭和59年 特許願 第198764号

2. 発明の名称

医療用組成物

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名 称 リビ イミューネム リサーチ,  
インコーポレイティド

4. 代理人

住 所 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号 静光虎ノ門ビル  
〒105 電話(504)0721

氏 名 弁理士 (6579) 青 木

朗



(外 4 名)

5. 補正命令の日付

自 他 補 正



6. 補正の対象

明 細

7. 補正の内容

明細書の修正(内容に変更なし)

8. 添附書類の目録

特 許 明 細 書

1 通